



*К Первому Белорусскому  
Биохимическому Конгрессу*

## ***СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОХИМИИ***

## **CURRENT PROBLEMS IN BIOCHEMISTRY**



*1 часть*

**ГРОДНО 2016 GRODNO**

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ

ОТДЕЛЕНИЕ МЕДИЦИНСКИХ НАУК

РЕСПУБЛИКАНСКОЕ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЕ  
УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ «ИНСТИТУТ БИОХИМИИ  
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ»

***СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОХИМИИ***

**CURRENT PROBLEMS IN BIOCHEMISTRY**

*Сборник научных статей*

*Часть 1*

Гродно

2016

## **ВЛИЯНИЕ ИОНОВ $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ И $\text{Co}^{2+}$ НА РАСЩЕПЛЕНИЕ ФИБРИНА ПРОТЕИНАЗАМИ**

Как известно, железо, медь и кобальт являются истинными биоэлементами и входят в состав ряда белков и небелковых соединений, что позволяет биомолекулам реализовывать функции, важные для нормальной жизнедеятельности организмов.

Однако избыточное поступление и (или) накопление любого из указанных элементов сопряжено с нарушениями функций, и в ряде случаев – весьма глубокими [1-3]. Несмотря на изучение биологической роли данных элементов и их токсического действия на протяжении довольно длительного времени, молекулярные механизмы воздействия катионов железа, меди и кобальта пока еще далеки от исчерпывающей ясности.

Одним из важных регуляторных механизмов метаболических и физиологических процессов является система протеолиза, компоненты и звенья которой участвуют практически во всех физиологических и почти во всех основных патологических процессах. Тем не менее, по-видимому, в силу чрезвычайно большого количества и разнообразия реакций и компонентов протеолиза о влиянии упомянутых катионов [например, о влиянии ионов меди 4, 5] на протеолитические процессы данных в литературе крайне недостаточно, и они не создают целостную картину.

Цель настоящей работы – раскрыть особенности действия ионов  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Co}^{2+}$  на фибринолитическую активность очищенных образцов протеиназ сериновых, цистеиновой и аспартильной.

Как и в предыдущих наших сообщениях [6, 7], в данной работе использованы образцы трипсина (КФ 3.4.21.4),  $\alpha$ -химотрипсина (КФ 3.4.21.1), пепсина (КФ 3.4.23.1) фирмы “Sigma” (США), папаина (КФ 3.4.22.2) фирмы “Fluka” (Швейцария). Плазмин человека (КФ 3.4.21.7) выделяли из обогащенного  $\beta$ -глобулинами осадка белков плазмы крови методом аффинной хроматографии, как описано ранее [6], используя сырье с исходно высоким содержанием активного плазмина. Фибриноген человека и тромбин были производства РНПЦ гематологии и трансфузиологии Минздрава Республики Беларусь, другие реактивы квалификации «хч» или «чда» были производства стран СНГ, их использовали после соответствующей дополнительной очистки.

Для определения фибринолитической активности протеиназ использовали фибриновые пластины, подвергнутые УФ-облучению и не содержащие функционально активного плазминогена. Подробно определение фибринолитической активности (в  $\text{мм}^2$  площади зон лизиса фибринового геля) описано нами ранее [6, 7]. Преимущество этой модели заключается в том, что протеиназа вносится в систему уже сформированного достаточно прочного фибринового геля. Это позволяет вести работу с соединениями, вызывающими выпадение в осадок из раствора других субстратов: глобулярных белков или производных пептидов.

Учитывая феномен фосфатного эффекта в протеолизе [8], определение активности проведено и в 0,15 М растворе NaCl, и в 0,06 М фосфатном буфере. Ионы металлов добавляли в виде  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

Все исследования выполнены не менее чем четырехкратно, результаты обработаны статистически с вычислением *t*-критерия Стьюдента. В тексте ниже описаны только статистически достоверные результаты ( $P \leq 0,05$ ).

Добавление ионов  $\text{Fe}^{2+}$  при использовании в качестве растворителя 0,15 М раствора NaCl мало отразилось на фибринолитической активности трипсина. Лишь при максимальной концентрации  $\text{Fe}^{2+}$  активность снижалась на 16%, тогда как ионы  $\text{Cu}^{2+}$  в концентрации  $10^{-3}$ – $10^{-2}$  М вызвали увеличение активности протеиназы на 20 и 16% соответственно (рис. 1).

Замена раствора NaCl фосфатным буфером вела к заметному угнетению фибринолитической активности трипсина ионами  $\text{Fe}^{2+}$  в концентрации  $10^{-3}$  и  $10^{-2}$  М на 36 и 84% соответственно. Эффект ионов меди изменился менее сильно: в диапазоне концентраций  $10^{-4}$ – $10^{-2}$  М расщепление фибрина составило 22–32%. Добавление ионов  $\text{Co}^{2+}$  мало влияло на активность трипсина в обоих случаях.

На фибринолитическую активность химотрипсина при использовании в качестве растворителя 0,15 М раствора NaCl исследуемые катионы металлов влияли сильнее.

В присутствии ионов  $\text{Fe}^{2+}$  во всем диапазоне концентраций расщепление фибрина этой протеиназой возрастало на 22–90% с максимальным эффектом при более низких концентрациях:  $10^{-7}$ – $10^{-4}$  М (рис. 1).

Особенно сильное увеличение активности энзима наблюдалось при добавлении ионов меди. Ионы  $\text{Co}^{2+}$  также вызвали рост интенсивности фибринолиза, но в меньшей степени, чем ионы меди. В фосфатном буфере нарастание фибринолитической активности химотрипсина в присутствии ионов железа не превысило 55%. При максимальной же концентрации катиона выявлено даже подавление активности протеиназы на 87%.

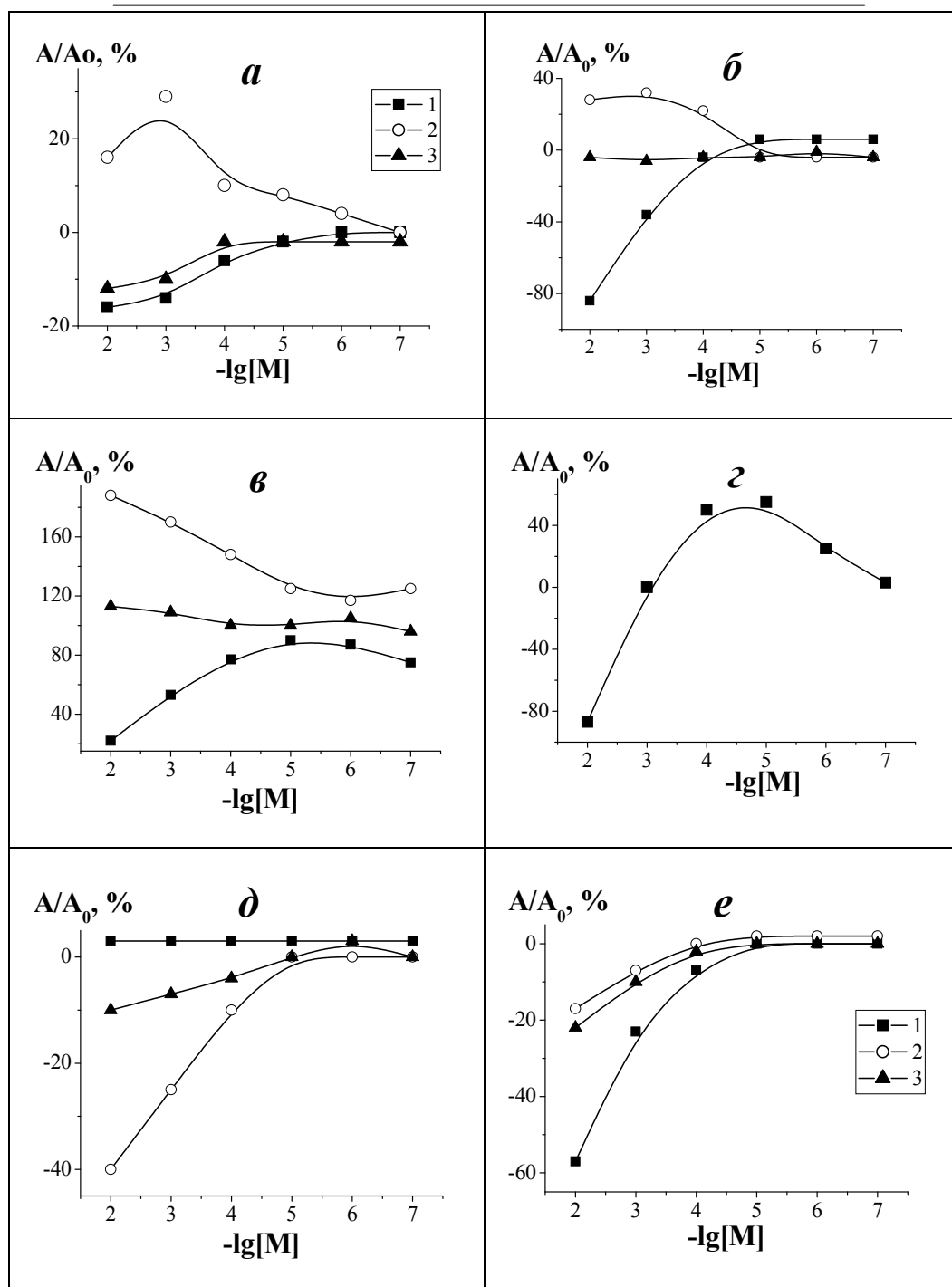


Рисунок 1 – Влияние ионов  $\text{Fe}^{2+}$  (1),  $\text{Cu}^{2+}$  (2) и  $\text{Co}^{2+}$  (3) на фибринолитическую активность (в % к контролю) трипсина (*a*, *б*),  $\alpha$ -химотрипсина (*в*, *г*) и плазмина (*д*, *е*), в 0,15 M растворе NaCl (*a*, *в*, *д*) или 0,06 M фосфатном буфере (*б*, *г*, *е*)

Фібринолітычная актыўнасць плазмін у 0,15 М растворе NaCl пры дадаванні іонаў  $\text{Fe}^{2+}$  ці  $\text{Co}^{2+}$  сутэсна не мянялася, а катіоны  $\text{Cu}^{2+}$  у канцэнтрацыі  $10^{-3}$  і  $10^{-2}$  М падаўлялі актыўнасць пратэіназы на 25 і 40% адпаведна (рис. 1). У фосфатным жа буферы пры дадаванні іонаў  $\text{Fe}^{2+}$  у канцэнтрацыі  $10^{-3}$  і  $10^{-2}$  М актыўнасць плазмін угнеталася на 23 і 57% адпаведна. У фосфатным буферы праяўлялася угнетаючая актыўнасць пратэіназы дзейства іонаў  $\text{Co}^{2+}$  у максімальнай канцэнтрацыі. Эфект жа  $\text{Cu}^{2+}$  заметна аслабляўся: падаўленне актыўнасці не перавышала 17%.

Пры ісправанні ў якасстве растваральніка 0,15 М раствора NaCl іоны  $\text{Fe}^{2+}$  слаба ўплывалі на фібринолітычную актыўнасць папаіна: угнетенне актыўнасці энзіма пры максімальнай канцэнтрацыі іонаў металла складало 20% (рис. 2). Пры гэтай жа канцэнтрацыі катіонаў  $\text{Co}^{2+}$  угнетенне актыўнасці дасягало 30%, а дадаванне катіонаў  $\text{Cu}^{2+}$  у дыяпазоне канцэнтрацый  $10^{-4}$ – $10^{-2}$  М суправаджалася зніжэннем фібринолітычнай актыўнасці на 34–100%.

У прысутствіі іонаў неарганічнага ортофосфата інгібіруючы эфект усіх катіонаў узмацняўся: для іонаў  $\text{Fe}^{2+}$  у канцэнтрацыі  $10^{-3}$  і  $10^{-2}$  М он склаў 20 і 38%, дзейства іонаў меді праяўлялася ўжэ пры канцэнтрацыі  $10^{-5}$  М, а поўная утрата актыўнасці адзначена і пры канцэнтрацыі іх  $10^{-3}$  М.

Эфект іонаў  $\text{Co}^{2+}$  пры іх максімальнай канцэнтрацыі склаў 47%, а на фібринолітычную актыўнасць пепсіна ісследаваныя катіоны металлов незалежна ад віда растваральніка не ўплывалі ў ўсім канцэнтрацыйным дыяпазоне (рис. 2).

Ітак, найбольшае дзейства ісследаваныя катіоны металлов аказалі на серіновыя пратэіназы і цистеіновую пратэіназу папаін. Дзейства на пепсін было мінімальным. Гэта наводзіць на мысль, што ў ісправаных канцэнтрацыях упамнутыя катіоны не вызвалі значымых для функцыі пратэіназы змяненняў яе канфармацыі, ібо фібрыновы гел – дастаткова рыхідны структурна субстрат. Аднак гэта не азначае, што на другіх белках субстратах ўплыві катіонаў на актыўнасць пепсіна не праявіцца. Раней на серіновых пратэіназах і папаіне паказана сутэсная залежнасць ўплывання іонаў  $\text{Mn}^{2+}$  і  $\text{Ni}^{2+}$  ад расщепляемага белка субстрата [9].

Найбольшы эфект аказалі катіоны жалеза і меді. Прысутствіе іонаў неарганічнага фосфата ўзмацняла падаўленне актыўнасці серіновых пратэіназ катіонамі жалеза. Актыўнасць жа цистеінавай пратэіназы папаіна (яго ўсёма ўсловна можна лічыць падобіем цистеінавых катэпсінаў, псколькі ўсе яны маюць функцыянальна важны астаток цистеіна ў актывным цэнтры) ў такім случае сильней угнеталася іонамі меді. Гэта можа быць абумоўлена большым ўзаемадзействам  $\text{Cu}^{2+}$  з функцыянальна значымі для каталіза HS-групамі цистеіна. Фосфатны эфект ў пратэолізе быў намі апісаны, аднак механізм яго пака застаецца нязвученым. Магчыма, ў прысутствіі іонаў неарганічнага

ортофосфата изменяется конформация молекулы протеиназы и возрастает доступность ее функциональных групп, особенно полярного характера.

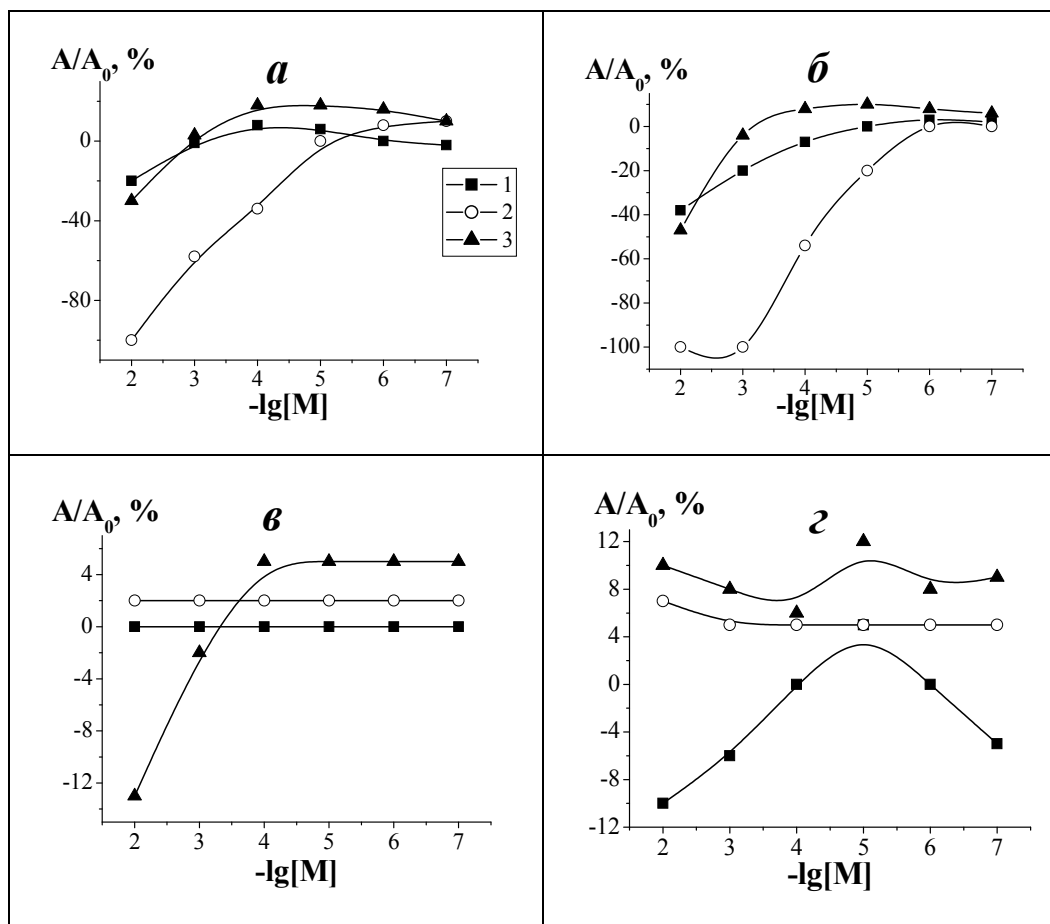


Рисунок 2 – Влияние ионов  $\text{Fe}^{2+}$  (1),  $\text{Cu}^{2+}$  (2) и  $\text{Co}^{2+}$  (3) на фибринолитическую активность (в % к контролю) папаина (*a*, *б*), пепсина (*в*, *з*), в 0,15 М растворе NaCl (*a*, *в*) или 0,06 М фосфатном буфере (*б*, *з*)

Приведенные выше сдвиги активности обнаружены при очень высоких для клетки концентрациях катионов металлов, тогда как таковая для протеиназ в данных экспериментах не превышала  $10^{-6}$  М. Казалось бы, полученные данные вносят вклад только в понимание токсического действия  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$ .

Однако эксперименты выполнены в модельных молекулярных системах, а в клетках и тканях многие процессы идут на границе раздела фаз, в частности, на протеиназах, связанных со специфическими рецепторами, например, на плазмине, рецепторы которого обнаружены в целом ряде клеток [10]. Поэтому соотношение молекул белка и катионов металла в определенном сайте в конкретное время может быть 1:1 и даже превышать эту величину. Плазмин же участвует в активации матриксных металлопротеиназ, факторов роста: TGF- $\beta$ , bFGF, VEGF, регуляции экспрес-

сии факторов транскрипции c-FOS и EGR-1 [10, 11]. Кроме того, на мембранах разнообразных клеток имеются рецепторы, активируемые протеиназами (PAR<sub>1</sub>–PAR<sub>4</sub>), в том числе трипсином [12]. Трипсин и плазмин(оген) синтезируются рядом клеток, включая клетки головного мозга, где играют важную роль в их физиологии и патологии. Включение таких рецепторов способно вызывать достаточно сильные ответные реакции в целом ряде клеток, тканей и органов.

Все это позволяет заключить, что глубокое раскрытие природы действия катионов металлов и других эффекторов требует проведения широкого фронта работ, включая многие регуляторные механизмы и целевые объекты, на которые эти механизмы направлены – в данном случае реакции протеолиза и белки субстраты. Этот ракурс остается пока изученным крайне недостаточно.

#### *Список литературы*

1. Ward, R. J. Neurodegenerative diseases and therapeutic strategies using iron chelators / R. J. Ward, D. T. Dexter, R. R. Crichton // J. Trace Elem. Med. Biol. – 2015. – Vol. 31. – P. 267–273.
2. Cao, H. In vivo effects of high dietary copper levels on hepatocellular mitochondrial respiration and electron transport chain enzymes in broilers / H. Cao [et al.] // Br. Poult. Sci. – 2016. – Vol. 57, No. 1. – P. 63–70.
3. Czarnek, K. Selected aspects of the action of cobalt ions in the human body / K. Czarnek, S. Terpiłowska, A. K. Siwicki // Cent. Eur. J. Immunol. – 2015. – Vol. 40, No. 2. – P. 236–242.
4. Stone, L. A. Inhibition of proteinase K activity by copper (II) ions / L. A. Stone [et al.] // Biochemistry. – 2007. – Vol. 46, No. 1. – P. 245–252.
5. Grasso, G. Metal ions affect insulin-degrading enzyme activity / G. Grasso [et al.] // J. Inorg. Biochem. – 2012. – Vol. 117. – P. 351–358.
6. Никандров, В. Н. Методы исследования протеолиза / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова // Современные проблемы биохимии. Методы исследований. – Минск: Выш. шк., 2013. – Гл. 5. – С. 132–157.
7. Pyzhova, N. S. Effect of active oxygen species scavengers on fibrinolytic activity of some proteinases / N. S. Pyzhova, V. N. Nikandrov, N. N. Nikandrov // Thromb. Res. – 1996. – Vol. 82. – P. 303–312.
8. Пыжова, Н. С. Влияние биогенных фосфатов на расщепление белков протеиназами и функцию активаторов пламиногена / Н. С. Пыжова, В. Н. Никандров // Биоорг. химия. – 2008. – Т. 34, № 3. – С. 382–391.
9. Никандров, В. Н. Особенности влияния ионов Ni(II) и Mn(II) на расщепление белков-субстратов протеиназами / В. Н. Никандров, В. Н. Ильюкевич, Е. И. Петрова // Актуальные проблемы экологии. Матер. X междунар. научно-практ. конф., Гродно, 1–3 октября 2014 г. Гродненский гос. ун-т им. Я.Купалы редкол. В. Н. Бурдь [и др.] – Гродно, 2014. – ч. 1. – С. 181–183.
10. From plasminogen to plasmin: role of plasminogen receptors in human cancer / M. Didiasova [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2014. – Vol. 15, No 11. – P. 21229–21252.
11. De Sousa, L. P. Plasminogen/plasmin regulates c-fos and egr-1 expression via the MEK/ERK pathway/ L. P. De Sousa [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – Vol. 329. – P. 237–245.
12. Evolution of the protease-activated receptor family in vertebrates / M. Jin [et al.] // Int. J. Mol. Med. – 2016. – Vol. 37, No 3. – P. 593–602.



*N. S. Pyzhova, V. N. Nikandrov*

EFFECT OF  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  AND  $\text{Co}^{2+}$  IONS ON FIBRIN CLEAVAGE BY  
PROTEINASES

Features of  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  effect in concentration of  $10^{-7}$ – $10^{-2}$  M on cleavage of fibrin gel plates by trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, plasmin, papain and pepsin were established. Changes of the cation's effects in the presence of inorganic orthophosphate ions were demonstrated. The necessity of wide front of multidimensional researches, especially on action of proteolytic reactions on target protein substrates for disclosure of the mechanism of  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  (and other ions) effect on biosystems was concluded.